

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lea Tomášová

Úloha protoonkogenu crk v invazivitě

The role of proto-oncogene crk in invasiveness

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Daniel Rösel, PhD.

Praha 2013

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala všem, kteří mě během psaní bakalářské práce podporovali, především pak svému školiteli RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky a za čas, který mi věnoval.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2013

Lea Tomášová

Abstrakt

Protoonkogen Crk byl identifikován jako onkogenní produkt ptačího retroviru v roce 1988. Je to adaptorový protein obsahující SH2 a SH3 vazebné domény. Díky těmto doménám umožňuje meziproteinové interakce a významně se tak podílí na přenosu signálu v buňce. Crk tvoří signální komplexy s mnoha proteiny a ovlivňuje tak řadu buněčných událostí, mezi nimi také pohyb buněk a jejich schopnost vytvářet tumory a invadovat do okolní tkáně. Zvýšená invazivita umožňuje nádorovým buňkám opouštět primární tumory a tvořit metastázy, což je velice problematický aspekt rakovinných onemocnění. Deregulace Crk proteinu byla pozorována u řady nádorových onemocnění, především pak v případě agresivních a vysoce metastatických nádorů. Tato práce popisuje způsoby, kterými se Crk může podílet na regulaci pohybu a invazivity buněk.

Klíčová slova: protoonkogen Crk, invazivita, adaptorové proteiny, signalizace, SH2 a SH3 domény, Rho GTPázy

Abstract

Proto-oncogene Crk was identified as an oncogenic product of an avian retrovirus in 1988. It is an adaptor protein containing SH2 and SH3 binding domains. Thanks to these domains Crk facilitates protein-protein interactions and therefore plays a crucial role in signal transduction. Crk forms signal complexes with several proteins and hence impacts many cellular processes, among them cell migration, tumorigenesis and invasion of the surrounding tissues. The increased invasiveness allows the tumour cells to detach from the primary tumour and form metastasis which is very problematic feature of cancer. Overexpression of Crk was observed in several tumour tissues, it correlates with an aggressive and metastatic phenotype of the tumours. The subject of this thesis is to describe the mechanisms of how Crk can regulate cellular motility and invasiveness.

Key words: proto-oncogene Crk, invasiveness, adaptor proteins, signalling, SH2 and SH3 domains, Rho GTPases

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract	3
Seznam zkratek	5
1 Úvod	7
2 Crk adaptorový protein a jeho struktura	8
2.1 Proteiny rodiny Crk.....	8
2.2 Struktura	9
2.2.1 SH2 doména	9
2.2.2 SH3 domény	10
2.3 Autoregulace CrkII	11
2.3.1 ISC region	11
2.3.2 Fosforylace Y221.....	11
2.4 Deregulace Crk proteinu v nádorových tkáních	12
2.4.1 miR-126.....	13
3 Pohyb a invazivita buněk a Rho GTPázy	14
3.1 Rho GTPázy	14
3.2 Pohyb buněk.....	15
3.3 Invazivita.....	17
4 Crk signalizace.....	18
4.1 p130CAS/Crk komplex	18
4.2 Crk/DOCK180 komplex a aktivace Rac	19
4.3 Crk/C3G komplex a aktivace Rap1	20
4.4 Crk a aktivace RhoA.....	21
4.5 Vliv Crk na produkci metaloproteáz	22
4.6 Crk a p120 katenin.....	22
4.7 Vliv Crk fosforylace na přežívání invadujících buněk.....	23
5 Závěr	24
Seznam literatury	25

Seznam zkratek

Abl	nereceptorová Tyr protein kináza (<u>A</u> belson leukemia viral oncogene homolog)
AMT	améboidně-mezenchymální přechod (<u>a</u> moeboid- <u>m</u> esenchymal <u>t</u> ransition)
AP-1	transkripční faktor (<u>a</u> ctivator <u>p</u> rotein 1)
ARAP3	GEF pro RhoA (<u>A</u> rf-GAP with <u>R</u> ho-GAP domain, <u>A</u> NK repeat and <u>P</u> H domain-containing protein 3)
ARP2/3	<u>a</u> ctin <u>r</u> elated <u>p</u> rotein 2/3
C3G	<u>C</u> rk SH3-binding guanine nucleotide releasing factor
c-CBL	ubiquitin ligáza (<u>c</u> ellular <u>C</u> asitas <u>B</u> -lineage lymphoma proto-oncogene)
c-Crk	buněčný homolog Crk
CD44	receptor kyseliny hyaluronové, povrchový glykoprotein
Cdc42	malá GTPáza rodiny Rho (<u>c</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ontrol protein <u>42</u> homolog)
Crk	<u>C</u> T10 <u>r</u> egulator of <u>k</u> inase
CrkL	<u>C</u> rk-like
CT10	<u>c</u> hicken <u>t</u> umour <u>10</u> virus
DOCK180	<u>d</u> edicator <u>o</u> f <u>c</u> ytokinesis
ECM	mezibuněčná hmota (<u>e</u> xtracellu <u>m</u> ar <u>m</u> atrix)
Egfl7	<u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>l</u> ike protein 7
ELMO	<u>e</u> ngulfment and cell <u>m</u> otility protein
ERM	rodina proteinů <u>e</u> zrin, <u>r</u> adixin, <u>m</u> oesin
FAK	nereceptorová Tyr protein kináza (<u>f</u> ocal <u>a</u> dhesion <u>k</u> inase)
FG-M	buněčná linie vysoce metastatických buněk pankreatu
Gab1	adaptorový protein (<u>G</u> RB2- <u>a</u> ssociated- <u>b</u> inding protein 1)
GAPs	<u>G</u> TPase <u>a</u> ctivating <u>p</u> roteins
GDI	guanine nucleotide <u>d</u> issociation <u>i</u> nhibitors
GEFs	guanine nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actors
Grb2	growth factor <u>r</u> eceptor- <u>b</u> ound protein-2
HeLa	buněčná linie lidských epiteliálních buněk
HGF	hepatocytární růstový faktor (<u>h</u> epatocyte <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
IRS-1	<u>i</u> nsulin <u>r</u> eceptor <u>s</u> ubstrate 1
ISC	region Crk proteinu (<u>i</u> nter-SH3 <u>c</u> ore)
JNK	protein kinázy rodiny MAPK (c- <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>k</u> inases)
LIMK	<u>L</u> im domain-containing <u>k</u> inase
MAPK	<u>m</u> itogen- <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inases
MAT	mezenchymálně-améboidní přechod (<u>m</u> esenchymal- <u>a</u> moeboid <u>t</u> ransition)

MCAS	buněčná linie lidských buněk vaječníku (<u>m</u> ucinous <u>c</u> yst <u>a</u> denocarcinoma cell line)
MDCK	buněčná linie psích epiteliálních buněk (<u>M</u> adin- <u>D</u> arby <u>C</u> anine <u>k</u> idney epithelial cells)
MEK1	<u>M</u> APK/ <u>E</u> RK <u>k</u> ináza
miR-126	micro-RNA 126
MLC	lehký řetězec myosinu (<u>m</u> ynosin <u>l</u> ight <u>c</u> hain)
MLCK	<u>m</u> ynosin <u>l</u> ight <u>c</u> hain <u>k</u> inase
MMPs	matrixové metaloproteázy
Nck	adaptorový protein
NSCLC	buněčná linie buněk nemalobuněčného karcinomu plic (<u>n</u> on- <u>s</u> mall <u>c</u> ell <u>l</u> ung <u>c</u> ancer)
p120ctn	p120 katenin
p130Cas	<u>C</u> rk- <u>a</u> ssociated <u>s</u> ubstrate
PAK1	Ser/Thr protein kináza (<u>p</u> 21- <u>a</u> ctivated <u>k</u> inase 1)
PI(4)P5	phosphatidylinositol 4- <u>p</u> hosphate 5 kinase
PI3	<u>p</u> hospho <u>i</u> nositide <u>3</u> -kinase
PPII	polyprolinový motiv II
PTB	fosfotyrozín vazebná doména (<u>p</u> hospho <u>t</u> yrosine- <u>b</u> inding domain)
Rac	malá GTPáza rodiny Rho (<u>R</u> as-related <u>C</u> 3 botulinum toxin substrate)
Rap1	malá GTPáza (<u>R</u> as-related <u>p</u> rotein 1)
Ras	rodina malých GTPáz (<u>r</u> at <u>s</u> arcoma)
Rho	rodina malých GTPáz (<u>R</u> as <u>h</u> omolog gene family)
RhoA	malá GTPáza rodiny Rho (<u>R</u> as <u>h</u> omolog gene family, member <u>A</u>)
ROCK	<u>R</u> ho- <u>a</u> ssociated <u>c</u> oiled-coil-containing protein <u>k</u> inase
SH2	<u>S</u> rc <u>h</u> omology <u>2</u> doména
SH3	<u>S</u> rc <u>h</u> omology <u>3</u> doména
SH3C	C-koncová SH3 doména Crk proteinu
SH3N	N-koncová SH3 doména Crk proteinu
SOS	GEF pro Ras (<u>s</u> on <u>o</u> f <u>s</u> evenless)
SP1	transkripční faktor (<u>s</u> pecificity <u>p</u> rotein <u>1</u>)
Src	nereceptorová Tyr protein kináza (<u>s</u> arcoma)
STAT5	transkripční faktor (<u>s</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription 5)
uPAR	receptor pro urokinázový aktivátor plazminogenu uPA (<u>u</u> rokinase <u>p</u> lasminogen <u>a</u> ctivator <u>r</u> eceptor)
v-Crk	virový homolog Crk
WASP	<u>W</u> iskott- <u>A</u> ldrich syndrome protein

1 Úvod

Adaptorový protein Crk byl identifikován před 25 lety jako onkogenní produkt ptačího retroviru CT10, který způsobuje nádorovou transformaci buněk. Crk se skládá z SH2 a SH3 vazebných domén a postrádá vlastní enzymatickou aktivitu. Jeho objevení bylo impulsem k analýze vazebných domén proteinů a jejich interakcí, což zásadně ovlivnilo chápání toho, jak funguje přenos signálů v buňkách. Vazebné domény zprostředkovávají interakce mezi proteiny a zajišťují tak přenos signálu. Adaptorové proteiny jsou důležitými stavebními jednotkami signálních drah, protože umožňují tvorbu signálních komplexů a přenos signálů v buňce. Crk interaguje s řadou proteinů a podílí se na velkém množství signálních drah, které ovlivňují proliferaci buněk, buněčný cyklus, apoptózu nebo fagocytózu. Důležitý je jeho podíl na regulaci migrace a adheze a jeho vliv na invazivitu buněk.

Protoonkogen Crk je konzervován v mnohobuněčných organismech a je exprimován ve všech tkáních. Je spojován s řadou nádorových onemocnění. Jeho exprese je zvýšená v několika typech nádorových tkání, především pak u tumorů s agresivním a invazivním fenotypem.

Schopnost nádorových buněk oddělit se od primárního tumoru a invadovat do okolní tkáně umožňuje tvorbu metastáz a vznik sekundárních tumorů v jiných tkáních. Aby bylo možné kontrolovat šíření nádorových buněk, je potřeba porozumět mechanismům vedoucím k pohybu buňky. Tato práce se zaměřuje na mechanismy, kterými protoonkogen Crk může přispívat k invazivnímu charakteru buněk.

2 Crk adaptorový protein a jeho struktura

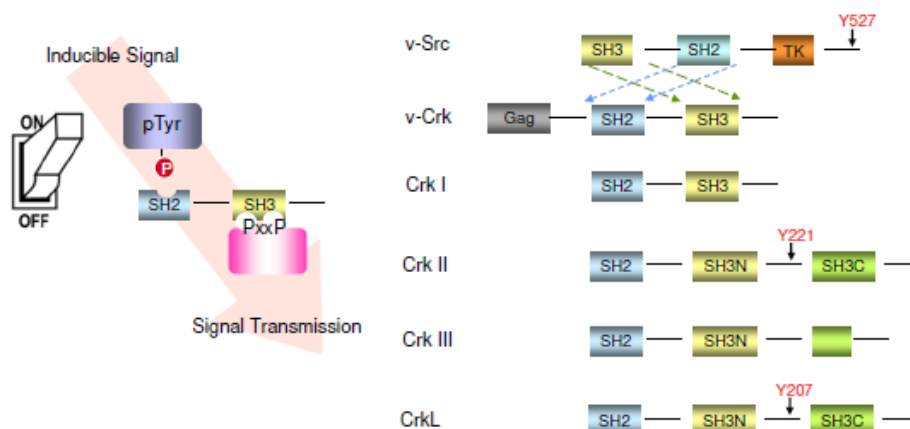
Crk je cca 300 aminokyselin dlouhý adaptorový protein obsahující několik SH2 a SH3 protein vazebných domén. Název těchto strukturně konzervovaných domén (*Src Homology*) je odvozen od jejich homologie s krátkými vazebnými doménami onkoproteinu Src. Byly identifikovány u řady dalších proteinů, ale pouze adaptorové proteiny Crk, CrkL, Grb2 a Nck jsou složeny výhradně z těchto domén. Jejich společným rysem je to, že nemají žádnou vlastní katalytickou aktivitu. Funkcí adaptorových proteinů je zprostředkovat interakci mezi proteiny, které se podílí na přenosu signálu v buňkách, a umožňují tak skládání signálních komplexů. Vznik takových komplexů je klíčový pro přenos signálu a regulaci mnoha buněčných událostí (shrnutí v Birge et al., 1996).

2.1 Proteiny rodiny Crk

v-Crk je prvním popsáním adaptorovým proteinem (Matsuda and Kurata, 1996). Byl identifikován v roce 1988 jako onkogenní produkt ptačího retroviru CT10. Název proteinu, v-Crk (*viral CT10 regulator of kinase*), byl odvozen od skutečnosti, že buňky transformované tímto onkogenem vykazují vyšší hladinu proteinů s fosforylovanými tyrozíny (Mayer et al., 1988).

Později byl z lidských embryonálních buněk izolován buněčný homolog c-Crk, ze kterého vznikají alternativním sestřihem proteiny c-CrkI (28 kDa) a c-CrkII (42 kDa). CrkI se, obdobně jako v-Crk, skládá z jedné SH2 domény na N-koncové části proteinu a jedné SH3 domény. Oproti CrkII postrádá CrkI 170 nukleotidů dlouhou C-koncovou sekvenci, která mimo jiné kóduje C-koncovou SH3 doménu (Matsuda et al., 1992).

Dále byl identifikován příbuzný protein c-CrkL (*Crk-like*). Kóduje ho CrkL gen lokalizovaný na lidském chromozomu 22q11 (ten Hoeve et al., 1993). Obsahuje také jednu SH2 doménu a dvě SH3 domény, ale i přes jeho velkou míru podobnosti s CrkII není jejich role v buněčné signalizaci zcela totožná. Liší se svoji afinitou k vazebným proteinům a aktivují rozdílné signální dráhy (Wang et al., 2011; Yanagi et al., 2012). Posledním popsáním členem Crk rodiny je CrkIII, který vzniká alternativním sestřihem ze stejného genu jako CrkI a CrkII. Je podobný CrkII, ale má narušenou C-koncovou SH3 doménu (Prosser et al., 2003). Jeho funkce v buňkách doposud není zcela jasná.



Obr. 2.1: Schema přenosu signálu přes SH2 a SH3 vazebné proteiny a schematické uspořádání SH2 a SH3 domén u jednotlivých členů Crk rodiny adaptorových proteinů v porovnání se Src. Na obrázku jsou vyznačeny regulační fosforylační místa Y221 u CrkII, Y207 u CrkL a Y527 u Src. TK je kinázová doména Src, Gag je specifický skupinový antigen kódovaný CT10 retrovirem. Převzato a upraveno dle (Birge et al., 2009).

2.2 Struktura

Protože Crk nemá enzymatickou aktivitu a skládá se jen z vazebných domén, počáteční výzkum proteinu se soustředil především na analýzu vazebných motivů jeho SH domén a identifikaci proteinů, které se na ně váží, což umožnilo zjistit, na jakých signálních drahách se Crk podílí.

SH2 doména

SH2 domény jsou asi 100 aminokyselin dlouhé sekvence. Crk SH2 doména je umístěna na N-koncové části proteinu (aminokyseliny 13-118). Matsuda a kol. ukázali, že SH2 doména v-Crk váže proteiny, které jsou fosforylovány na tyrozínech (Matsuda et al., 1991). Specifitu a afinitu vazby dále určuje několik aminokyselinových zbytků následujících fosfotyrozín v C-koncovém směru (shrnutí v Birge and Hanafusa, 1993). Pomocí pokusů s umělými peptidy obsahujícími fosfotyrozín bylo zjištěno, že Crk SH2 doména preferenčně váže peptidy obsahující prolin v pozici +3 od fosfotyrozínu, tedy pTyr-x-x-Pro motiv (Songyang et al., 1993).

To bylo následně potvrzeno i identifikací proteinů, které jsou rozpoznávány Crk SH2 doménou. K nim patří především proteiny fokálních adhezí p130Cas (Sakai et al., 1994) a paxilin (Birge et al., 1993), Gab1 (Garcia-Guzman et al., 1999) nebo receptory růstových faktorů (shrnutí v Feller et al., 1998).

SH3 domény

SH3 domény jsou přibližně 60 aminokyselin dlouhé sekvence, které interagují s oblastmi bohatými na prolin, s tzv. polyprolinovými motivy II. typu (PPII). Vazebný motiv proteinů, které se váží na N-koncovou SH3 doménu Crk (SH3N), obsahuje kromě několika prolinů také leucin na 4. pozici a především lysin v pozici 7:

x-Pro-x-(Leu)-Pro-x-Lys-x-x. Pokusy, ve kterých byl lysin v této pozici nahrazen argininem, ukázaly, že lysin je klíčový pro zajištění vysoké afinity vazby a také nedovoluje těmto motivům interagovat s jinými SH3 doménami (Knudsen et al., 1995). Na SH3N doménu se vážou aktivátory malých G proteinů, jako je C3G (GEF pro Rap1) (Knudsen et al., 1994; Matsuda et al., 1994), DOCK180 (aktivátor Rac1) (Hasegawa et al., 1996) a SOS (GEF pro Ras) (Matsuda et al., 1994), dále pak Abl kináza (Feller et al., 1994) nebo PI3 kináza (Sattler et al., 1997).

U proteinů CrkII a CrkL se vyskytuje atypická C-koncová SH3 doména (SH3C). Jako ostatní SH3 domény má strukturu β -barelu, ovšem u ostatních SH3 domén konzervované aromatické aminokyseliny vytvářející kanonické vazebné místo pro PPII jsou nahrazeny aminokyselinami polárními; SH3C proto není schopná PPII vázat (Muralidharan et al., 2006). Funkce SH3C domény je především autoregulační, v souvislosti se stabilizací sbalené struktury CrkII, viz dále. Uvažuje se také o případné účasti SH3C v nekanonických signálních drahách, protože obsahuje potenciální vazebné místo pro další proteiny. Je jím tyrozín 251, který, v závislosti na fosforylaci zprostředkované Abl kinázou, může být rozpoznán SH2 nebo PTB doménami jiných proteinů (Sriram et al., 2011).

2.3 Autoregulace CrkII

Část CrkII proteinů v buňce se nachází v kompaktní sbalené formě, ve které je protein neaktivní a neinteraguje s vazebnými proteiny. Pro vznik sbalené struktury jsou důležité oblasti, které má CrkII navíc oproti CrkI, tedy SH3C doména a linker spojující SH3 domény. U CrkI ke sbalování nedochází. Zatímco CrkI je konstitutivně aktivní a váže své efektorové proteiny, fyziologická aktivita CrkII je sbalením potlačována a mezi volným CrkII a CrkII s navázanými efektorovými proteiny se v buňce ustavuje rovnováha. Ke skládání dochází i u CrkL, ale intramolekulární interakce vypadají u CrkL odlišně (obr. 2.2C), protože se liší uspořádání linkeru a SH3C domény u jinak velmi podobných CrkII a CrkL.

ISC region

Část linkeru mezi SH3N a SH3C doménami CrkII se označuje jako ISC, „*Inter SH3 core*“ (aminokyseliny 224-237). ISC může intramolekulárně interagovat s SH doménami, čímž dochází ke sbalení proteinu a zamaskování vazebných center SH2 a SH3N domén. Znemožní se tak interakce s SH2 a SH3N vazebnými proteiny. SH3C doména je potom nutná ke stabilizaci této sbalené struktury (obr. 2.2B). Vazebné proteiny, které se na SH3N vážou s vysokou afinitou, mohou vazbu na SH3N sbalenou strukturu molekuly rozrušit, CrkII znovu aktivovat a zapojit do signalizace (Kobashigawa et al., 2007).

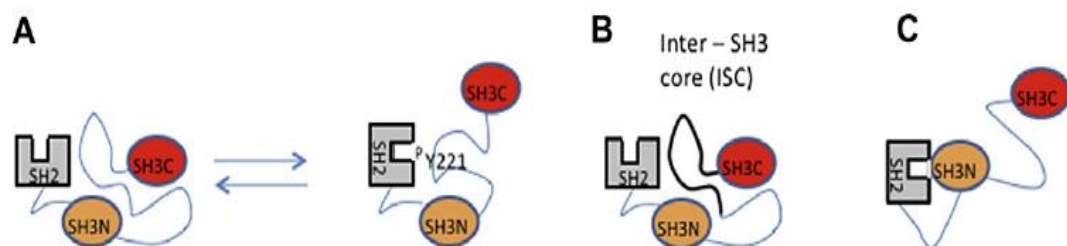
Fosforylace Y221

Dalším důležitým regulačním místem na linkeru mezi SH3 doménami CrkII je tyrozín 221 (Y221). Pokud dojde k jeho fosforylaci, tvoří se intramolekulární můstek mezi pY221 a SH2 doménou, protein se sbalí. Sbalením proteinu se stane nepřístupnou pro vazbu i SH3N doména (obr. 2.2A).

Za fosforylaci CrkII Y221 jsou zodpovědné kinázy rodiny Abl (Feller et al., 1994).

Regulace Crk a jeho schopnosti tvořit signální komplexy pomocí Abl hraje důležitou roli v migraci, invazivitě a přežívání buněk (kap. 4.7) (Kain et al., 2003).

V CrkL se vyskytuje fosforylační místo na tyrozinu 207 (Y207), které má podobnou funkci jako Y221 u CrkII. I u CrkL dochází k interakci pY207 s vlastní SH2 doménou, ale tato konformační změna neinhibuje vazbu SH3N vazebných proteinů (Jankowski et al., 2012).



Obr. 2.2: Ve složeném stavu není CrkII molekula schopna vázat své efektorové proteiny. Ke složení proteinu dochází: (A) fosforylací Y221, která vede k intramolekulární vazbě s SH2 doménou; (B) v závislosti na interakcích mezi ISC a SH doménami. (C) U CrkL dochází k přímé interakci mezi SH2 a SH3N, kterou je zablokováno vazebné centrum SH2, ale nikoliv SH3N domény. Převzato a upraveno dle (Sriram and Birge, 2012)

2.4 Deregulace Crk proteinu v nádorových tkáních

Řada studií poukázala na to, že hladina Crk proteinu je zvýšená u mnoha typů nádorů. Nishihara a kol. imunohistochemickou analýzou identifikovali zvýšenou hladinu Crk ve vzorcích z nádorů plic, tlustého střeva, žaludku a prsu (Nishihara et al., 2002). Měření hladiny Crk mRNA ve vzorcích plicních adenomakarcinomů ukázalo, že exprese Crk je zvýšená především u pokročilých, málo diferenciovaných a invazivních nádorů (Miller et al., 2003). Vyšší hladina Crk mRNA u nádorových buněk a pozitivní korelace mezi zvýšenou mírou exprese Crk a stupněm onemocnění byla sledována také u glioblastomových buněk (Takino et al., 2003; Wang et al., 2007), nádorů prsu (Rodrigues et al., 2005), gastrických nádorů (Feng et al., 2010), nádorů prostaty (Dai et al., 2011) nebo nádorů ústní sliznice (Yamada et al., 2011). Inhibicí exprese Crk proteinu metodou RNA interference v těchto a dalších nádorových liniích byla potvrzena důležitost Crk pro navození agresivního invazivního fenotypu nádorových buněk. Lidské rakovinné buňky vaječníku (MCAS), ve kterých byla inhibována exprese Crk, vykazovaly disorganizovaná aktinová vlákna, snížený počet fokálních adhezí, netvořily lamellopodia a ztratily schopnost intraperitoneálně se šířit v myši (Linghu et al., 2006). Potlačení exprese Crk vede ke snížení migračního a invazivního potenciálu u buněk výše jmenovaných nádorů. U nádorových buněk prsu, mozku a dlaždicobuněčných nádorů

hlavy a krku byla prokázána snížená schopnost tvorby tumorů *in vivo*, není-li Crk exprimován (Fathers et al., 2012; Wang et al., 2007; Yanagi et al., 2012).

miR-126

V nedávné době byla identifikována microRNA 126 (miR-126) jako negativní regulátor Crk exprese. Exprese miR-126 je snížena v nemalobuněčných nádorech plic (Crawford et al., 2008) a v gastrických rakovinných tkáních (Feng et al., 2010). Snížená exprese miR-126 koreluje s invazivním fenotypem buněk a s velikostí tumorů a ektopická exprese miR-126 inhibuje invazivitu buněk *in vitro* a je schopná potlačit metastatický potenciál gastrických rakovinných buněk *in vivo*. Imunochemickou analýzou vzorků gastrických nádorů bylo potvrzeno, že hladina Crk a miR-126 spolu negativně korelují. K negativní regulaci exprese Crk pomocí miR-126 dochází na posttranskripční úrovni, protože hladina Crk mRNA není miR-126 ovlivněna.

Watanabe a kol. zjistili, že miR-126 je epigeneticky umlčována DNA methylací *Egfl7*¹ genu v tkáních plicních nádorů (Watanabe et al., 2012).

Objev miR-126 a její deregulace nastínil jeden ze způsobů, kterým může docházet ke zvýšení exprese Crk v nádorových tkáních.

¹ *Egfl7* gen kóduje endoteliálními buňkami exprimovaný EGF-like protein 7, který je důležitý pro vaskulogenezi. Sedmý intron tohoto genu kóduje miR-126 (shrnutí v Meister and Schmidt, 2010).

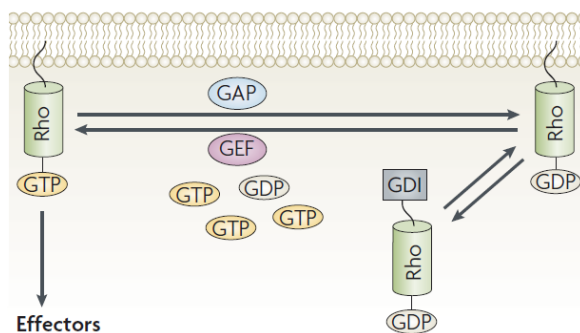
3 Pohyb a invazivita buněk a Rho GTPázy

Nádorové buňky mají schopnost migrovat a invadovat do okolních tkání. Mohou proniknout do krevního oběhu a usadit se ve vzdálených orgánech, kde tvoří metastázy. Jako invazivita se označuje schopnost buněk pronikat okolní pojivovou tkání. Invazivita je závislá na procesech, které vedou ke změnám tvaru buňky a k jejímu pohybu. V těle dochází k migraci některých buněk i při fyziologických procesech, jako je například hojení ran, pohyb buněk imunitního systému nebo embryonální morfogeneze. Nádorové buňky využívají obdobné mechanismy pohybu jako tyto buňky (shrnutí v Friedl and Wolf, 2003). Klíčovou roli v regulaci pohybu a invazivity buněk hrají malé Rho GTPázy.

3.1 Rho GTPázy

Rho GTPázy jsou skupina malých G proteinů rodiny Ras. Jsou důležité v regulaci aktinového cytoskeletu a tudíž v regulaci procesů, které vedou k pohybu buňky. Do rodiny Rho GTPáz patří několik dalších podskupin proteinů, z nichž nejlépe prostudované jsou GTPázy rodiny Rac, Cdc42 a Rho.

GTPázy mohou být v buňkách v aktivním stavu s navázaným GTP, nebo v neaktivním stavu, kdy váží GDP. Pro jejich aktivaci jsou nutné proteiny, které fungují jako výměnné faktory guaninových nukleotidů (GEFs) a katalyzují disociaci GDP a vazbu GTP. Dalšími proteiny, které regulují aktivitu GTPáz, jsou GAPs (*GTPase activating proteins*) a GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*). GAPs i GDIs Rho GTPázy inaktivují. GAPs stimulují hydrolýzu GTP na GDP a GDIs se vážou na izoprenylovou skupinu Rho GTPáz, čímž znemožňují jejich lokalizaci v membráně a aktivaci pomocí GEF (obr. 3.1).



Obr. 3.1: Regulace Rho GTPáz. Rho GTPázy jsou aktivovány pomocí GEF, které katalyzují výměnu GDP za GTP, zatímco GAP a GDI Rho GTPázy inaktivují. Převzato z (Heasman and Ridley, 2008).

Aktivované Rho GTPázy interagují se svými efektorovými proteiny a aktivují je. Fungují tudíž jako molekulární spínače procesů v buňce (shrnutí v Heasman and Ridley, 2008; Jaffe and Hall, 2005).

3.2 Pohyb buněk

Pohyb buňky je výsledkem cyklu opakujících se kroků. Nejprve dochází k protažení a polarizaci buňky. Ve směru migrace se polymerizací aktinových vláken tvoří výběžky cytoplasmatické membrány – lamelopodia a filopodia. Rostoucí výběžky vytváří adhezivní kontakty s extracelulární hmotou (ECM), tzv. fokální adheze. Poté dochází ke kontrakci těla buňky a přitažení její koncové části a celá buňka se takto posouvá vpřed (shrnutí v Friedl and Wolf, 2003; Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Protažení buňky a vznik výběžků

K protažení buňky dochází díky polymerizaci aktinových vláken. Polymerující aktinová vlákna vytlačují cytoplasmatickou membránu ve směru pohybu, čímž vznikají výběžky. Polymerizaci aktinu zajišťuje ARP2/3 nukleární komplex, který je aktivován WASP proteinem v závislosti na aktivitě GTPáz Rac a Cdc42. (Obr. 3.2A)

Adheze buňky k ECM

Interakce s ECM je závislá na integrinech - adhezivních molekulách cytoplasmatické membrány, které přenášejí signály z ECM dovnitř buňky. Integriny se naváží na složky ECM a pomocí svých intracelulárních domén aktivují v buňce signalizaci závislou na fosforylaci a defosforylaci signálních proteinů. Dochází ke vzniku signálních komplexů, zvaných fokální komplexy, které propojují ECM přes integriny na aktinový cytoskelet. Jejich maturací a napojením na stresová aktinová vlákna se následně vytvářejí větší adhezivní struktury zvané fokální adheze. Na stavbě fokálních adhezí se podílí řada adaptorových a regulačních proteinů, jako je například talin, paxilin, FAK a p130Cas, které mezi sebou interagují pomocí vazebných domén. (Obr. 3.2B)

Štěpení ECM v blízkosti buňky

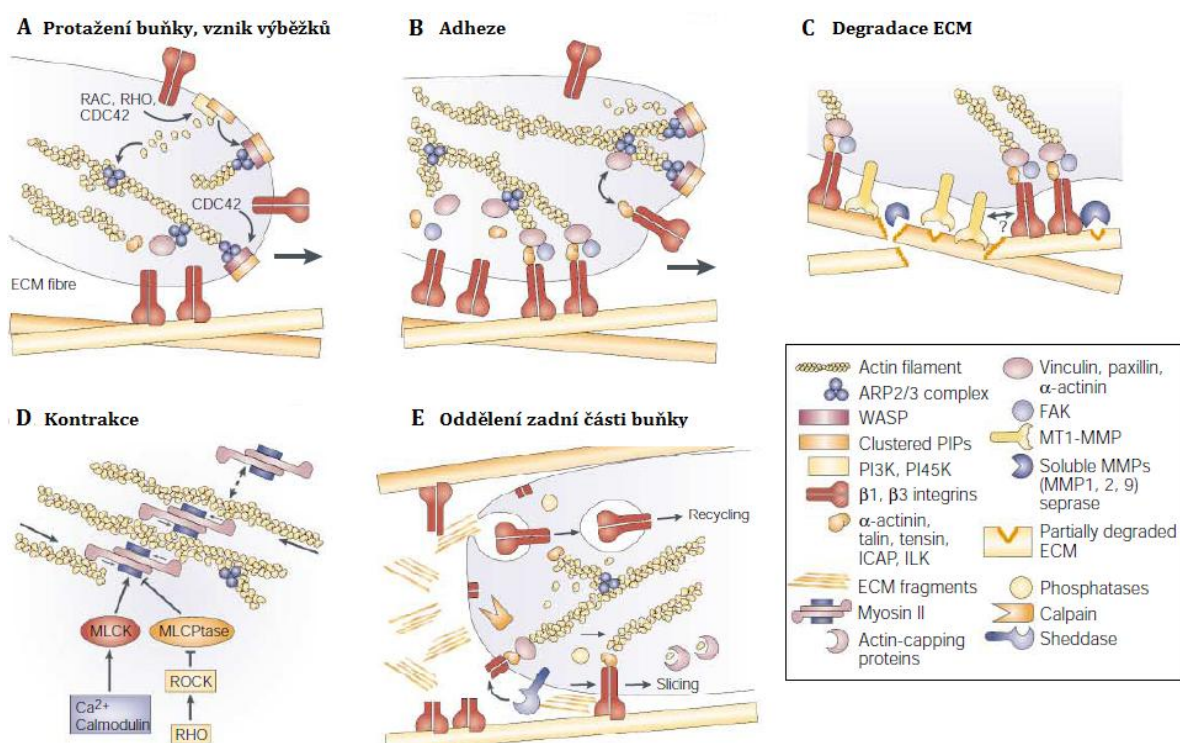
Při pohybu buněk v 3D prostředí dochází ke štěpení ECM pomocí sekretovaných nebo povrchových proteáz, které se hromadí v místech kontaktů s ECM. Nejvýznamnější skupinou proteáz účastnících se degradace ECM při pohybu buněk jsou matrixové metaloproteázy, MMPs. (Obr. 3.2C)

Kontrakce buněčného těla

Tělo buňky se posouvá vpřed kontrakcí aktomyosinového cytoskeletu. Důležitou roli v regulaci aktomyosinové kontrakce hraje Rho-ROCK signální dráha. Vazba myosinu II na aktin je závislá na fosforylaci lehkého řetězce myosinu (MLC), která je zprostředkována MLC kinázou (MLCK). Fosforylace myosinu je regulována MLC fosfatázou, která je inhibována ROCK kinázou v závislosti na aktivaci Rho GTPázy. (Obr. 3.2D)

Uvolnění koncové části buňky od podkladu

Aby se celá buňka mohla posunout ve směru pohybu, musí dojít k uvolnění spojů s ECM na její koncové části. Dochází k rozvolnění fokálních adhezí, degradaci aktinových vláken a k rozrušení spojů mezi integriny a ECM, přičemž integriny mohou být odštěpeny, nebo internalizovány a recyklovány. (Obr. 3.2E)



Obr. 3.2: Jednotlivé kroky pohybu buňky. Převzato a upraveno z (Friedl and Wolf, 2003).

3.3 Invazivita

Nádorové buňky mohou invadovat do okolních tkání individuálně, nebo kolektivně. Individuální invazivita pak probíhá améboidním nebo mezenchymálním způsobem, podle toho, jaké mechanismy buňka k svému pohybu využívá (shrnutí v Friedl, 2004; Pankova et al., 2010).

Mezenchymální typ invazivity

Při mezenchymálním typu invazivity se buňka pohybuje způsobem popsaným výše, má protáhlý tvar, ve směru svého pohybu tvoří výběžky zvané invadopodia a produkuje matrixové metaloproteázy (MMPs), které štěpí složky ECM.

Mezenchymální invazivita je závislá na integriny zprostředkované adhezi buněk k ECM, na signalizaci malých Rho GTPáz rodiny Rac a Cdc42 a na degradaci extracelulární matrix.

Améboidní typ invazivity

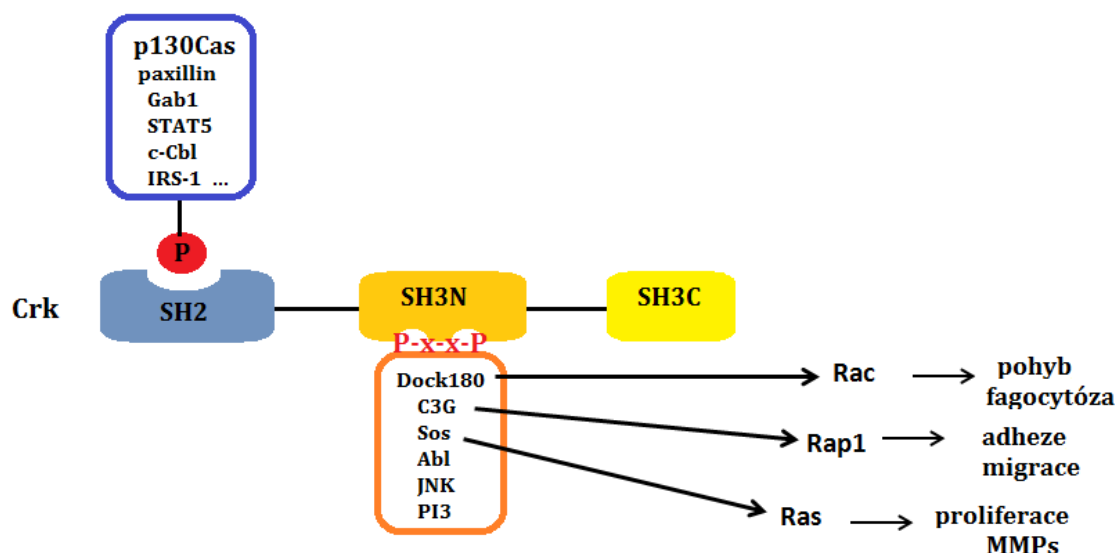
Améboidní typ pohybu je založen na kontraktilitě kortikálního aktomyosinového cytoskeletu, který je regulován především Rho-ROCK signální dráhou. Buňka pohybující se améboidním způsobem má kulatý tvar, na povrchu tvoří struktury zvané „bleby“, je snadno deformovatelná a protlačuje se skrz ECM bez její degradace, přičemž využívá trakční sílu vyvinutou kortikálním cytoskeletem a již existující volné prostory v ECM (Sahai and Marshall, 2003; Wolf et al., 2003). Adhezivita améboidních buněk je nízká, což jim umožňuje pohybovat se rychleji, než v případě mezenchymálního typu invazivity.

V závislosti na podmínkách může invadující buňka přecházet mezi mezenchymálním a améboidním způsobem pohybu. Způsob pohybu je typický pro danou buněčnou linii, ale dojde-li k zablokování nebo naopak stimulaci některé ze signálních drah podporujících jeden nebo druhý mechanismus pohybu, může buňka změnit své chování; taková změna je pak označována jako mezenchymálně-améboidní přechod (MAT), případně améboidně-mezenchymální přechod (AMT). Například zablokováním degradace ECM inhibicí proteáz u mezenchymálně se pohybujících metastatických buněk nedošlo k potlačení jejich migrace v 3D kolagenu, ale k jejich přechodu na améboidní typ pohybu (Wolf et al., 2003).

4 Crk signalizace

Adaptorové proteiny rodiny Crk jsou využívány velkým množstvím drah signální transdukce. Přenášejí signály, které ovlivňují řadu fyziologických i patofyziologických událostí v buňce (shrnutí v Birge et al., 2009). Patří k nim buněčná diferenciace, proliferace, apoptóza, fagocytóza patogenů a apoptotických buněk, regulace buněčného cyklu nebo - z hlediska této práce především zajímavá – regulace aktinového cytoskeletu a pohybu buněk.

Crk integruje signály vyvolané růstovými faktory, cytokiny, patogeny nebo složkami ECM. Ty jsou na Crk přinášeny interakcí s fosforylovanými SH2 vazebnými proteiny. Aktivaci SH3 vazebných proteinů je signál přenášen dále k efektorovým proteinům (obr. 4.1).



Obr. 4.1: Signalizace přes Crk adaptorový protein. Signál, který vyvolá fosforylaci Crk SH2 vazebných proteinů, je přes Crk a jeho SH3 vazebné proteiny přenášen na další efektorové proteiny. Crk se podílí na velkém množství signálních drah. Pro pohyb a invazivitu buněk je důležitá především Crk závislá aktivace malých GTPáz: Rac stimuluje tvorbu lamelopodií, Rap1 ovlivňuje adhezivitu buněk a Ras aktivuje produkci matrixových metaloproteáz (MMPs).

4.1 p130CAS/Crk komplex

p130Cas byl identifikován jako hlavní protein fosforylovaný na tyrozínech ve v-Crk transformovaných buňkách (Sakai et al., 1994). Jedná se o adaptorový protein fokálních adhezí, který obsahuje několik protein vazebných domén a slouží jako jakési lešení pro

meziproteinové interakce.

Substrátová doména p130Cas obsahuje 15 Tyr-x-x-Pro vazebných motivů Crk SH2 domény. Fosforylace těchto motivů je zprostředkována Src kinázami v závislosti na integrinové signalizaci (Vuori et al., 1996) a vede ke vzniku p130Cas/Crk komplexu. Klemke a kol. zjistili, že fosforylovaný p130Cas indukuje migraci a zvyšuje invazivní potenciál buněk *in vivo*, přičemž tento efekt je závislý na interakci p130Cas a Crk a následné aktivaci Rac signalizace (Klemke et al., 1998). Tvorba p130Cas/Crk komplexu je nutná pro prodloužení buňky a vznik výběžků membrány při chemotaxi (Cho and Klemke, 2002). Kromě regulace migrace p130Cas/Crk signalizace také potlačuje apoptózu během invaze (Cho and Klemke, 2000). Formace p130Cas/Crk komplexu tedy funguje jako „molekulární spínač“ migrace a přispívá k invazivnímu charakteru nádorových buněk.

Díky interakci p130Cas s Crk dochází k lokalizaci Crk k membráně (Klemke et al., 1998). Spolu s Crk tam jsou přinášeny i proteiny, které konstitutivně váží jeho SH3N doménu. Tyto proteiny následně aktivují signalizaci, vedoucí mimo jiné k navození invazivního fenotypu buňky. K SH3N vazebným proteinům, jejichž signalizace má vliv migraci a pohyb buňky, patří především DOCK180 a C3G.

Dalším z SH2 vazebných proteinů, který aktivuje Crk signalizaci, je kromě p130Cas také adaptorový protein Gab1. K jeho fosforylaci a tvorbě Gab1/Crk komplexu dochází po stimulaci hepatocytárním růstovým faktorem (HGF) (Garcia-Guzman et al., 1999). Gab1/Crk komplex je nutný pro HGF vyvolanou invazivitu synoviálních sarkomových buněk (Watanabe et al., 2006). Potlačení exprese Crk v těchto buňkách vedlo k snížení jejich invazivity a tumorigeneze *in vivo*, ale také ke snížení fosforylace Gab1. Ukázalo se, že Crk funguje jako zprostředkovatel trvalé Src závislé fosforylace Gab1 v HGF stimulovaných buňkách (Watanabe et al., 2009).

4.2 Crk/DOCK180 komplex a aktivace Rac

DOCK180 byl identifikován jako Crk SH3N vazebný protein (Hasegawa et al., 1996; Matsuda et al., 1996), který je schopný aktivovat Rac GTPázu v závislosti na interakci s p130Cas/Crk komplexem (Kiyokawa et al., 1998). DOCK180 je atypický guanin-nukleotid výměnný faktor (GEF), který k aktivaci Rac GTPázy potřebuje proteiny rodiny ELMO (Brugnera et al., 2002). Interakce DOCK180 s p130Cas/Crk komplexem vede

k jeho lokalizaci do fokálních adhezí, kde aktivuje Rac (Wang et al., 2010).

Rac GTPázy tvoří podskupinu v rámci rodiny Rho GTPáz. Rac stimuluje tvorbu lamelopodií a filopodií a hraje tudíž důležitou roli pro pohyb a invazivitu buněk.

Zvýšení exprese Crk vede k aktivaci Rac a zvýšení invazivity MDCK buněk (Lamorte et al., 2002), zatímco v buňkách, v níž byla exprese Crk umlčena pomocí RNA interference, byla aktivita Rac snížena a schopnost invadovat byla potlačena (Linghu et al., 2006; Watanabe et al., 2006). Role p130Cas/Crk/DOCK180 závislé aktivace Rac byla prokázána také v invazitě indukované urokinázovým receptorem (uPAR), který je ve zvýšené míře exprimován v řadě nádorových buněk (Smith et al., 2008).

Způsobů, jak Rac ovlivňuje polymerizaci aktinu, která vede k tvorbě výběžků cytoplazmatické membrány, je několik. Rac například aktivuje WAVE/Arp2/3 komplex, což vede k polymerizaci a větvení aktinu. Rac má také vliv na uvolnění proteinů blokujících konce aktinových vláken a s pomocí LIMK inaktivuje fosforylací kofilin, který je zodpovědný za depolymeraci aktinových vláken (shrnutí v Ridley, 2001). Rac ovlivňuje pohyb a invazivitu buněk indukcí tvorby fokálních komplexů (Nobes and Hall, 1995). p130Cas/Crk/DOCK180 závislá aktivace Rac hraje také důležitou úlohu v aktivaci JNK signalizace stimulované integrinovými receptory (Dolfi et al., 1998).

4.3 Crk/C3G komplex a aktivace Rap1

C3G byl identifikován jako GEF, který se specificky a s vysokou afinitou váže na Crk SH3N přes prolin bohaté oblasti svého centrálního regionu (Knudsen et al., 1994; Tanaka et al., 1994). C3G je aktivátor malé GTPázy Rap1 (Gotoh et al., 1995), přičemž pro tuto aktivaci je nutná interakce C3G s Crk (Posern et al., 2000).

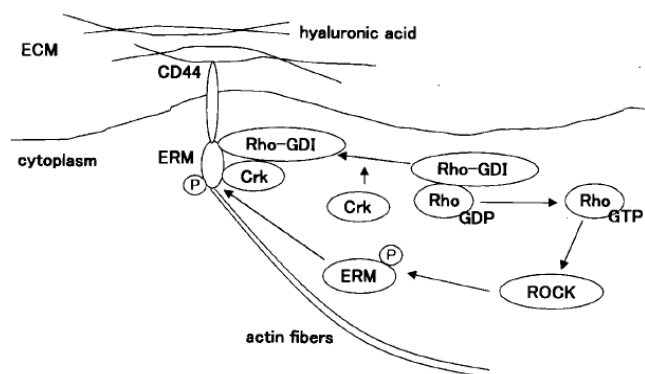
Rap1 je protein strukturně podobný Ras GTPáze (Kawata et al., 1988) a podílí se na regulaci buněčné adheze, například tím, že zesiluje aktivaci integrinů (shrnutí v Boettner and Van Aelst, 2009). Nedávný článek Huanga a kol. také spojuje aktivaci Rap1 se zvýšeným metastatickým potenciálem pankreatických buněk *in vivo* v závislosti na EGFR signalizací (Huang et al., 2012; citováno dle Tsuda and Tanaka, 2012).

Mezi efektorové proteiny Rap1 patří i protein ARAP3, který funguje jako GAP pro RhoA GTPázu (Krugmann et al., 2004). Antoku a kol. ukázali, že Crk je důležitý pro regulaci dynamiky fokálních adhezí a navrhli, že by ji mohl ovlivňovat právě signalizací přes Rap1 a RhoA (Antoku and Mayer, 2009). Nepodařilo se jim ale jednoznačně prokázat,

zda vliv Crk na dynamiku FA je skutečně závislý na RhoA, tuto možnost je ještě třeba ověřit dalšími experimenty.

4.4 Crk a aktivace RhoA

Několik studií ukázalo, že transformace buněk v-Crk proteinem vede k aktivaci RhoA GTPázy. Aktivací RhoA a jejích efektorových kináz ROCK a PI(4)P5-K se Crk podílí na tvorbě stresových vláken a uspořádávání fokálních adhezí (Altun-Gultekin et al., 1998; Tsuda et al., 2002). U melanomových buněk je v závislosti na aktivaci Eph receptorů² Crk nutný pro aktivaci RhoA, zakulacování buněk, ztrátu adhezivity k substrátu a tvorbu „blebů“ (Lawrenson et al., 2002). Tsuda a kol. také zjistili, že Crk je důležitý pro kyselinou hyaluronovou indukovanou migraci buněk v mozku (Tsuda et al., 2004). Crk závislá aktivace RhoA/ROCK vede k fosforylaci ERM proteinů (ezrin, radixin, moesin), které propojují receptor pro kyselinu hyaluronovou (CD44) s aktinovým cytoskeletem. Jakým způsobem Crk aktivuje RhoA však dosud není zcela jasné. Není znám žádný GEF pro RhoA, který by se vázal na Crk. Crk by ale mohl aktivovat RhoA vyvázáním proteinu inaktivující RhoA, tedy Rho-GDI, jak ukazuje obrázek 4.2. Tuto možnost je třeba dále prozkoumat, protože Tsuda a kol. sice pozorovali interakci GDI s ektopicky exprimovaným Crk, ale interakce s endogenním Crk prokázána nebyla.



Obr. 4.2: Schema možného způsobu Crk zprostředkované aktivace RhoA v buňkách migrujících ke kyselině hyaluronové. Crk váže ERM proteiny a GDI a aktivuje tak RhoA GTPázu. Ta následně aktivuje ROCK kinázu, která fosforyluje ERM proteiny, čímž je umožněno propojení CD44 receptoru a aktinových vláken a migrace buněk za kyselinou hyaluronovou. Převzato z (Tsuda et al., 2004).

² Eph receptorové kinázy a jejich ligandy ephriny jsou důležité pro regulaci pohybu a adheze buněk především během vývoje, k zvýšení jejich exprese však dochází také u řady tumorů (shrnutí v Dodelet and Pasquale, 2000).

4.5 Vliv Crk na produkci metaloproteáz

Matrixové metaloproteázy (MMPs) je rodina enzymů, které degradují složky mezibuněčné hmoty a usnadňují tak pohyb buněk v ECM. MMPs hrají důležitou úlohu v mezenchymální invazivitě nádorových buněk.

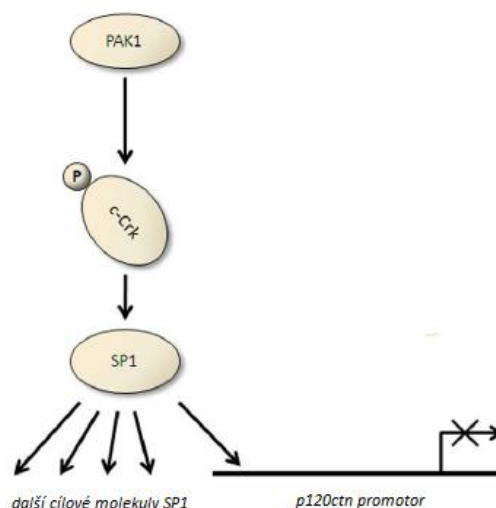
Krysí fibroblasty transformované v-Crk produkují větší množství těchto enzymů (Hasegawa et al., 2009; Liu et al., 2000). Crk indukovaná sekrece MMPs je závislá na Ras – MEK1 signální dráze. Exprese mutovaných neaktivních forem proteinů Ras a MEK1 vede k potlačení zvýšené produkce MMP ve v-Crk transformovaných buňkách a inhibuje invazivitu těchto buněk (Liu et al., 2000).

Jedním z vazebných proteinů Crk SH3 domény je SOS (Matsuda et al., 1994), který funguje jako GEF pro Ras (Chardin et al., 1993). Interakce Crk s SOS vede k aktivaci Ras-MEK1-MAPK signální dráhy, která vyústí produkcí MMPs.

Důležitou roli ve zvýšené tvorbě invadopodií a invazivitě buněk transformovaných v-Crk hraje transkripční faktor AP-1, který se váže na promotory MMPs a aktivuje jejich transkripci (Hasegawa et al., 2009). AP-1 je regulován MAP-kinázami (MAPK), mezi které patří také kinázy JNK. Crk a JNK se podílí na signální dráze Met receptoru hepatocytárního růstového faktoru (HGF). Jeho stimulace v HeLa buňkách vedla k tvorbě Gab1/Crk komplexu a na něm závislé aktivaci JNK signální dráhy, která vedla k aktivaci MMP-1 promotoru (Garcia-Guzman et al., 1999).

4.6 Crk a p120 katenin

p120 katenin (p120ctn) je jedním z proteinů, které vytváří adhezivní spoje mezi buňkami. Je důležitý pro stabilizaci kadherinů a jejich propojení s cytoskeletem. Hladina p120 kateninu je snížena v některých typech tumorů. Potlačením exprese p120 kateninu dochází ke ztrátě integrity a přilnavosti buněk, což způsobuje jejich zvýšenou schopnost invadovat a tvořit metastázy. Mortazavi a kol. zjistili, že hladina proteinu Crk v buňkách nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) negativně koreluje s hladinou p120 kateninu a že Crk je zodpovědný za transkripční represi p120 kateninu. Na promotoru genu pro p120ctn se přímo váže transkripční faktor SP1, který interaguje s Crk a následně inhibuje expresi p120ctn (Mortazavi et al., 2011). Regulace p120ctn je závislá na fosforylaci Crk, konkrétně na fosforylaci serinu 41, za kterou je zodpovědná PAK1 kináza (Rettig et al., 2012).



Obr. 4.3: Schema regulace exprese p120 kateninu. PAK1 kináza fosforyluje Ser41 Crk. Následně se transkripční faktor SP1 váže na p120catenin promotor a inhibuje transkripci.

Převzato a upraveno z (Rettig et al., 2012).

4.7 Vliv Crk fosforylace na přežívání invadujících buněk

Rakovinné buňky jsou schopné invadovat do jiných tkání a přežívat v nich, zatímco u normálních netransformovaných buněk by jejich případný únik do cizího prostředí vedl k apoptóze, programované buněčné smrti. Molekulární mechanismy kontrolující migraci a apoptózu v normálních a rakovinných buňkách jsou regulovány interakcemi s adhezivními proteiny a růstovými faktory přítomnými v ECM. Například aktivace integrinů vede k tvorbě p130Cas/Crk signálního komplexu, který, jak již bylo řečeno, podporuje migraci a také přežívání buněk při invazi do ECM (Cho and Klemke, 2000). Důležitou roli při rozhodování, zda bude buňka migrovat, nebo podstoupí buněčnou smrt, hraje regulace Crk signalizace fosforylací tyrozinu 221, která je zprostředkována Abl kinázami (kap. 2.3.2). Kain a kol. zjistili, že v buňkách vysoce metastatické linie pankreatických buněk FG-M je hladina fosforylace Y221 snížena a tudíž je zvýšená tvorba p130Cas/Crk komplexu. K zvýšení fosforylace Y221 naopak dochází u netransformovaných buněk po několika hodinách invaze do kolagenu v nepřítomnosti růstových faktorů, ve fázi, kdy u nich dochází k navození apoptózy. Inhibice Abl kinázy, která je za fosforylací Y221 zodpovědná, vedla k zvýšenému přežívání buněk (Kain et al., 2003).

5 Závěr

25 let výzkumu adaptorového proteinu Crk přineslo řadu důkazů o tom, že tento protein hraje klíčovou úlohu v nádorových onemocněních a jeho deregulace navozuje invazivní fenotyp nádorových buněk. Crk se podílí na přenosu signálu v buňkách a má vliv na regulaci aktinového cytoskeletu a pohybu buněk. Stimulace integrinů nebo receptorů růstových faktorů extracelulárními signály vede k aktivaci kaskády tyrozinových kináz uvnitř buňky a k fosforylaci proteinů jako je p130Cas. Tato fosforylace umožní jejich interakci s Crk, který následně přes své SH3 vazebné proteiny aktivuje další efektorové proteiny a signální dráhy. K migraci a invazivitě přispívá Crk především aktivací malých GTPáz jako je Rac, RhoA nebo Rap1, které ovlivňují dynamiku aktinového cytoskeletu a adhezi buněk. Adhezi Crk ovlivňuje také regulací p120 kateninu. Dále Crk aktivuje MAPK signální dráhu, to vede k produkci MMPs a degradaci ECM, což usnadňuje mezenchymální typ buněčné invazivity. Aktivace Crk signalizace navíc chrání invadující buňky i před apoptózou.

Signální dráhy, které ovlivňují migraci, jsou velmi komplikované, navzájem se ovlivňují a doplňují, což buňce umožňuje využít jiný mechanismus pohybu, je-li některá ze signálních drah zablokována. Jelikož se Crk podílí na drahách, které ovlivňují mezenchymální i améboidní typ migrace, stává se zajímavým terapeutickým cílem pro omezení invazivity nádorových buněk.

Seznam literatury

- Altun-Gultekin ZF, Chandriani S, Bougeret C, Ishizaki T, Narumiya S, de Graaf P, Henegouwen PVE, Hanafusa H, Wagner JA, Birge RB. 1998. Activation of Rho-dependent cell spreading and focal adhesion biogenesis by the v-Crk adaptor protein. *Molecular and Cellular Biology* 18(5):3044-3058.
- Antoku S, Mayer BJ. 2009. Distinct roles for Crk adaptor isoforms in actin reorganization induced by extracellular signals. *Journal of Cell Science* 122(22):4228-4238.
- Birge RB, Fajardo JE, Reichman C, Shoelson SE, Songyang Z, Cantley LC, Hanafusa H. 1993. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A HIGH-AFFINITY INTERACTION BETWEEN V-CRK AND TYROSINE-PHOSPHORYLATED PAXILLIN IN CT10-TRANSFORMED FIBROBLASTS. *Molecular and Cellular Biology* 13(8):4648-4656.
- Birge RB, Hanafusa H. 1993. CLOSING IN ON SH2 SPECIFICITY. *Science* 262(5139):1522-1523.
- Birge RB, Kalodimos C, Inagaki F, Tanaka S. 2009. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Communication and Signaling* 7.
- Birge RB, Knudsen BS, Besser D, Hanafusa H. 1996. SH2 and SH3-containing adaptor proteins: Redundant or Independent mediators of intracellular signal transduction. *Genes to Cells* 1(7):595-613.
- Boettner B, Van Aelst L. 2009. Control of cell adhesion dynamics by Rap1 signaling. *Curr Opin Cell Biol* 21(5):684-693.
- Brugnera E, Haney L, Grimsley C, Lu M, Walk SF, Tosello-Tramont AC, Macara IG, Madhani H, Fink GR, Ravichandran KS. 2002. Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* 4(8):574-582.
- Chardin P, Camonis JH, Gale NW, Vanaelst L, Schlessinger J, Wigler MH, Barsagi D. 1993. HUMAN SOS1 - A GUANINE-NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR FOR RAS THAT BINDS TO GRB2. *Science* 260(5112):1338-1343.
- Cho SY, Klemke RL. 2000. Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology* 149(1):223-236.
- Cho SY, Klemke RL. 2002. Purification of pseudopodia from polarized cells reveals redistribution and activation of Rac through assembly of a CAS/Crk scaffold. *Journal of Cell Biology* 156(4):725-736.
- Crawford M, Brawner E, Batte K, Yu L, Hunter MG, Otterson GA, Nuovo G, Marsh CB, Nana-Sinkam SP. 2008. MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373(4):607-612.

- Dai YQ, Qi L, Zhang XB, Li Y, Chen MF, Zu XB. 2011. Crkl and p130Cas complex regulates the migration and invasion of prostate cancer cells. *Cell Biochemistry and Function* 29(8):625-629.
- Dodelet VC, Pasquale EB. 2000. Eph receptors and ephrin ligands: embryogenesis to tumorigenesis. *Oncogene* 19(49):5614-5619.
- Dolfi F, Garcia-Guzman M, Ojaniemi M, Nakamura H, Matsuda M, Vuori K. 1998. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26):15394-15399.
- Fathers KE, Bell ES, Rajadurai CV, Cory S, Zhao H, Mourskaia A, Zuo DM, Madore J, Monast A, Mes-Masson AM, Grosset AA, Gaboury L, Hallet M, Siegel P, Park M. 2012. Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis. *Breast Cancer Research* 14(3):15.
- Feller SM, Knudsen B, Hanafusa H. 1994. C-ABL KINASE REGULATES THE PROTEIN-BINDING ACTIVITY OF C-CRK. *Embo Journal* 13(10):2341-2351.
- Feller SM, Posern G, Voss J, Kardinal C, Sakkab D, Zheng J, Knudsen BS. 1998. Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins. *Journal of Cellular Physiology* 177(4):535-552.
- Feng RH, Chen XH, Yu YY, Su LP, Yu BQ, Li JF, Cai Q, Yan M, Liu BY, Zhu ZG. 2010. miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer. *Cancer Letters* 298(1):50-63.
- Friedl P. 2004. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 16(1):14-23.
- Friedl P, Wolf K. 2003. Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 3(5):362-374.
- Garcia-Guzman M, Dolfi F, Zeh K, Vuori K. 1999. Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1-Crk signaling complex formation. *Oncogene* 18(54):7775-7786.
- Gotoh T, Hattori S, Nakamura S, Kitayama H, Noda M, Takai Y, Kaibuchi K, Matsui H, Hatase O, Takahashi H, Kurata T, Matsuda M. 1995. IDENTIFICATION OF RAP1 AS A TARGET FOR THE CRK SH3 DOMAIN-BINDING GUANINE NUCLEOTIDE-RELEASING FACTOR C3G. *Molecular and Cellular Biology* 15(12):6746-6753.
- Hasegawa H, Kiyokawa E, Tanaka S, Nagashima K, Gotoh N, Shibuya M, Kurata T, Matsuda M. 1996. DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Molecular and Cellular Biology* 16(4):1770-1776.
- Hasegawa H, Senga T, Ito S, Iwamoto T, Hamaguchi M. 2009. A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells. *Experimental Cell Research* 315(8):1384-1392.

- Heasman SJ, Ridley AJ. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(9):690-701.
- Huang M, Anand S, Murphy EA, Desgrosellier JS, Stupack DG, Shattil SJ, Schlaepfer DD, Cheresch DA. 2012. EGFR-dependent pancreatic carcinoma cell metastasis through Rap1 activation. *Oncogene* 31(22):2783-2793.
- Jaffe AB, Hall A. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:247-269.
- Jankowski W, Saleh T, Pai MT, Sriram G, Birge RB, Kalodimos CG. 2012. Domain organization differences explain Bcr-Abl's preference for CrkL over CrkII. *Nature Chemical Biology* 8(6):590-596.
- Kain KH, Gooch S, Klemke RL. 2003. Cytoplasmic c-Abl provides a molecular 'rheostat' controlling carcinoma cell survival and invasion. *Oncogene* 22(38):6071-6080.
- Kawata M, Matsui Y, Kondo J, Hishida T, Teranishi Y, Takai Y. 1988. A novel small molecular weight GTP-binding protein with the same putative effector domain as the ras proteins in bovine brain membranes. Purification, determination of primary structure, and characterization. *J Biol Chem* 263(35):18965-18971.
- Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T, Matsuda M. 1998. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes & Development* 12(21):3331-3336.
- Klemke R, Leng J, Molander R, Brooks P, Vuori K, Cheresch D. 1998. CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *Journal of Cell Biology* 140(4):961-972.
- Knudsen BS, Feller SM, Hanafusa H. 1994. 4 PROLINE-RICH SEQUENCES OF THE GUANINE-NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR C3G BIND WITH UNIQUE SPECIFICITY TO THE FIRST SRC HOMOLGY-3 DOMAIN OF CRK. *Journal of Biological Chemistry* 269(52):32781-32787.
- Knudsen BS, Zheng J, Feller SM, Mayer JP, Burrell SK, Cowburn D, Hanafusa H. 1995. AFFINITY AND SPECIFICITY REQUIREMENTS FOR THE FIRST SRC HOMOLGY-3 DOMAIN OF THE CRK PROTEINS. *Embo Journal* 14(10):2191-2198.
- Kobashigawa Y, Sakai M, Naito M, Yokochi M, Kumeta H, Makino Y, Ogura K, Tanaka S, Inagaki F. 2007. Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. *Nature Structural & Molecular Biology* 14(6):503-510.
- Krugmann S, Williams R, Stephens L, Hawkins PT. 2004. ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Current Biology* 14(15):1380-1384.
- Lamorte L, Rodrigues S, Naujokas M, Park M. 2002. Crk synergizes with epidermal growth factor for epithelial invasion and morphogenesis and is required for the Met morphogenic program. *Journal of Biological Chemistry* 277(40):37904-37911.

- Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84(3):359-369.
- Lawrenson ID, Wimmer-Kleikamp SH, Lock P, Schoenwaelder SM, Down M, Boyd AW, Alewood PF, Lackmann M. 2002. Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and de-adhesion of EphA3-expressing 293T and melanoma cells by CrkII and Rho-mediated signalling. *J Cell Sci* 115(Pt 5):1059-1072.
- Linghu H, Tsuda M, Makino Y, Sakai M, Watanabe T, Ichihara S, Sawa H, Nagashima K, Mochizuki N, Tanaka S. 2006. Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS. *Oncogene* 25(25):3547-3556.
- Liu EB, Thant AA, Kikkawa F, Kurata H, Tanaka S, Nawa A, Mizutani S, Matsuda S, Hanafusa H, Hamaguchi M. 2000. The Ras-mitogen-activated protein kinase pathway is critical for the activation of matrix metalloproteinase secretion and the invasiveness in v-crk-transformed 3Y1. *Cancer Research* 60(9):2361-2364.
- Matsuda M, Hashimoto Y, Muroya K, Hasegawa H, Kurata T, Tanaka S, Nakamura S, Hattori S. 1994. CRK PROTEIN BINDS TO 2 GUANINE NUCLEOTIDE-RELEASING PROTEINS FOR THE RAS FAMILY AND MODULATES NERVE GROWTH FACTOR-INDUCED ACTIVATION OF RAS IN PC12 CELLS. *Molecular and Cellular Biology* 14(8):5495-5500.
- Matsuda M, Kurata T. 1996. Emerging components of the Crk oncogene product: The first identified adaptor protein. *Cellular Signalling* 8(5):335-340.
- Matsuda M, Mayer BJ, Hanafusa H. 1991. IDENTIFICATION OF DOMAINS OF THE V-CRK ONCOGENE PRODUCT SUFFICIENT FOR ASSOCIATION WITH PHOSPHOTYROSINE-CONTAINING PROTEINS. *Molecular and Cellular Biology* 11(3):1607-1613.
- Matsuda M, Ota S, Tanimura R, Nakamura H, Matuoka K, Takenawa T, Nagashima K, Kurata T. 1996. Interaction between the amino-terminal SH3 domain of CRK and its natural target proteins. *Journal of Biological Chemistry* 271(24):14468-14472.
- Matsuda M, Tanaka S, Nagata S, Kojima A, Kurata T, Shibuya M. 1992. 2 SPECIES OF HUMAN CRK CDNA ENCODE PROTEINS WITH DISTINCT BIOLOGICAL-ACTIVITIES. *Molecular and Cellular Biology* 12(8):3482-3489.
- Mayer BJ, Hamaguchi M, Hanafusa H. 1988. A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 332(6161):272-275.
- Meister J, Schmidt MH. 2010. miR-126 and miR-126*: new players in cancer. *ScientificWorldJournal* 10:2090-2100.
- Miller CT, Chen G, Gharib TG, Wang H, Thomas DG, Misek DE, Giordano TJ, Yee J, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG. 2003. Increased C-CRK proto-oncogene expression is associated with an aggressive phenotype in lung adenocarcinomas. *Oncogene* 22(39):7950-7957.

- Mortazavi F, Dubinett S, Rettig M. 2011. c-Crk proto-oncogene contributes to transcriptional repression of p120-catenin in non-small cell lung cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 28(4):391-404.
- Muralidharan V, Dutta K, Cho J, Vila-Perello M, Raleigh DP, Cowburn D, Muir TW. 2006. Solution structure and folding characteristics of the C-terminal SH3 domain of c-Crk-II. *Biochemistry* 45(29):8874-8884.
- Nishihara H, Tanaka S, Tsuda M, Oikawa S, Maeda M, Shimizu M, Shinomiya H, Tanigami A, Sawa H, Nagashima K. 2002. Molecular and immunohistochemical analysis of signaling adaptor protein Crk in human cancers. *Cancer Letters* 180(1):55-61.
- Nobes CD, Hall A. 1995. RHO, RAC, AND CDC42 GTPASES REGULATE THE ASSEMBLY OF MULTIMOLECULAR FOCAL COMPLEXES ASSOCIATED WITH ACTIN STRESS FIBERS, LAMELLIPODIA, AND FILOPODIA. *Cell* 81(1):53-62.
- Pankova K, Rosel D, Novotny M, Brabek J. 2010. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(1):63-71.
- Posern G, Rapp UR, Feller SM. 2000. The Crk signaling pathway contributes to the bombesin-induced activation of the small GTPase Rap1 in Swiss 3T3 cells. *Oncogene* 19(54):6361-6368.
- Prosser S, Sorokina E, Pratt P, Sorokin A. 2003. CrkIII: a novel and biologically distinct member of the Crk family of adaptor proteins. *Oncogene* 22(31):4799-4806.
- Rettig M, Trinidad K, Pezeshkpour G, Frost P, Sharma S, Moatamed F, Tamanoi F, Mortazavi F. 2012. PAK1 kinase promotes cell motility and invasiveness through CRK-II serine phosphorylation in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 7(7):e42012.
- Ridley AJ. 2001. Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Science* 114(15):2713-2722.
- Rodrigues SP, Fathers KE, Chan G, Zuo DM, Halwani F, Meterissian S, Park M. 2005. Crkl and Crkl function as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells. *Molecular Cancer Research* 3(4):183-194.
- Sahai E, Marshall CJ. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nature Cell Biology* 5(8):711-719.
- Sakai R, Iwamatsu A, Hirano N, Ogawa S, Tanaka T, Mano H, Yazaki Y, Hirai H. 1994. A NOVEL SIGNALING MOLECULE, P130, FORMS STABLE COMPLEXES IN-VIVO WITH V-CRK AND V-SRC IN A TYROSINE PHOSPHORYLATION-DEPENDENT MANNER. *Embo Journal* 13(16):3748-3756.
- Sattler M, Salgia R, Shrikhande G, Verma S, Pisick E, Prasad KV, Griffin JD. 1997. Steel factor induces tyrosine phosphorylation of CRKL and binding of CRKL to a

- complex containing c-kit, phosphatidylinositol 3-kinase, and p120(CBL). *J Biol Chem* 272(15):10248-10253.
- Smith HW, Marra P, Marshall CJ. 2008. uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180. *Journal of Cell Biology* 182(4):777-790.
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ. 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72(5):767-778.
- Sriram G, Birge RB. 2012. Commentary: The carboxyl-terminal Crk SH3 domain: Regulatory strategies and new perspectives. *Febs Letters* 586(17):2615-2618.
- Sriram G, Reichman C, Tunceroglu A, Kaushal N, Saleh T, Machida K, Mayer B, Ge Q, Li J, Hornbeck P, Kalodimos CG, Birge RB. 2011. Phosphorylation of Crk on tyrosine 251 in the RT loop of the SH3C domain promotes Abl kinase transactivation. *Oncogene* 30(46):4645-4655.
- Takino T, Nakada M, Miyamori H, Yamashita J, Yamada KM, Sato H. 2003. CrkI adapter protein modulates cell migration and invasion in glioblastoma. *Cancer Research* 63(9):2335-2337.
- Tanaka S, Morishita T, Hashimoto Y, Hattori S, Nakamura S, Shibuya M, Matuoka K, Takenawa T, Kurata T, Nagashima K, Matsuda M. 1994. C3G, A GUANINE NUCLEOTIDE-RELEASING PROTEIN EXPRESSED UBIQUITOUSLY, BINDS TO THE SRC HOMOLOG-3 DOMAINS OF CRK AND GRB2 SH PROTEINS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(8):3443-3447.
- ten Hoeve J, Morris C, Heisterkamp N, Groffen J. 1993. ISOLATION AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF CRKL, A HUMAN CRK-LIKE GENE. *Oncogene* 8(9):2469-2474.
- Tsuda M, Makino Y, Iwahara T, Nishihara H, Sawa H, Nagashima K, Hanafusa H, Tanaka S. 2004. Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid. *Journal of Biological Chemistry* 279(45):46843-46850.
- Tsuda M, Tanaka S. 2012. Roles for crk in cancer metastasis and invasion. *Genes Cancer* 3(5-6):334-340.
- Tsuda M, Tanaka S, Sawa H, Hanafusa H, Nagashima K. 2002. Signaling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line. *Cell Growth & Differentiation* 13(3):131-139.
- Vuori K, Hirai H, Aizawa S, Ruoslahti E. 1996. Induction of p130(cas) signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: A role for Src family kinases. *Molecular and Cellular Biology* 16(6):2606-2613.
- Wang H, Linghu H, Wang J, Che YL, Xiang TX, Tang WX, Yao ZW. 2010. The role of Crk/Dock180/Rac1 pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SKOV3. *Tumor Biology* 31(1):59-67.

- Wang J, Che YL, Li G, Liu B, Shen TM, Wang H, Hua LH. 2011. Crk and CrkL Present With Different Expression and Significance in Epithelial Ovarian Carcinoma. *Molecular Carcinogenesis* 50(7):506-515.
- Wang L, Tabu K, Kimura T, Tsuda M, Linghu H, Tanino M, Kaneko S, Nishihara H, Tanaka S. 2007. Signaling adaptor protein Crk is indispensable for malignant feature of glioblastoma cell line KMG4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362(4):976-981.
- Watanabe K, Emoto N, Hamano E, Sunohara M, Kawakami M, Kage H, Kitano K, Nakajima J, Goto A, Fukayama M, Nagase T, Yatomi Y, Ohishi N, Takai D. 2012. Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 130(11):2580-2590.
- Watanabe T, Tsuda M, Makino Y, Ichihara S, Sawa H, Minami A, Mochizuki N, Nagashima K, Tanaka S. 2006. Adaptor molecule Crk is required for sustained phosphorylation of Grb2-associated binder 1 and hepatocyte growth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines. *Molecular Cancer Research* 4(7):499-510.
- Watanabe T, Tsuda M, Makino Y, Konstantinou T, Nishihara H, Majima T, Minami A, Feller SM, Tanaka S. 2009. Crk adaptor protein-induced phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration. *Cell Research* 19(5):638-650.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160(2):267-277.
- Yamada S, Yanamoto S, Kawasaki G, Rokutanda S, Yonezawa H, Kawakita A, Nemoto TK. 2011. Overexpression of CRKII increases migration and invasive potential in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 303(2):84-91.
- Yanagi H, Wang L, Nishihara H, Kimura T, Tanino M, Yanagi T, Fukuda S, Tanaka S. 2012. CRKL plays a pivotal role in tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma through the regulation of cell adhesion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418(1):104-109.